

# 大菜粉蝶颗粒体病毒的研究: 包含体结合的碱性蛋白酶

孟进军 李维琪

(中国科学院新疆化学研究所)

**摘要** 本文报道从新疆分离的一株大菜粉蝶 (*Pieris brassicae*) 颗粒体病毒 (PbGV) 包含体上结合有碱性蛋白酶。提取含酶的包含体蛋白, 以酪蛋白为底物鉴定表明此酶在 pH 9.4 有最大的酶活力, 并定位于“包裹”在病毒粒子套膜外的包含体蛋白中。在高 pH 时分子量为 26,500 的包含体蛋白被酶降解为 19,500 和 15,600 道尔顿的两个组分。 $\text{Hg}^{++}$ 、 $\text{Cu}^{++}$  仅部分抑制酶活力, 可被二异丙基氟磷酸 (DFP) 完全抑制。75°C 以上加热处理可使酶失活, 并大大降低病毒包含体的解离。推测此酶是影响 PbGV 对寄生感染率的因子之一。

**关键词** 大菜粉蝶颗粒体病毒 包含体 碱性蛋白酶

生物防治害虫早已受到人们的重视。一般认为杆状病毒 (Baculovirus) 在防治农业及森林害虫方面有很大潜力。杆状病毒包括核多角体病毒 (nucleo-polyhedrosis virus, 简称 NPV) 和颗粒体病毒 (granulosis virus, 简称 GV), 其特征之一是病毒粒子包埋在规则排列的结晶状基质蛋白即包含体蛋白之中。病毒包含体在感染寄主幼虫时首先在中肠解离, 释放出病毒粒子。Yamafuji 等 (1960) 首次报道了在家蚕 (*Bombyx mori*) NPV 的包含体上发现有蛋白水解酶活性。Summers 等 (1973) 提出了在高 pH 时粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) GV 包含体的溶解是由于酶的作用的初步证据。现已证实许多杆状病毒包含体中都结合着碱性蛋白酶 (David, 1978; 齐义鹏等, 1986) 及包含体蛋白的降解多半是酶作用的结果。因此研究此酶对于了解杆状病毒的生化特性及其感染机制有一定意义。我们于 1981 年在新疆分离出一株大菜粉蝶颗粒体病毒 (PbGV), 研究证实了在 PbGV 包含体上结合有碱性蛋白酶。自 Pailot 1926 年发现大菜粉蝶颗粒体病以来, 尚未见有 PbGV 包含体结合碱性蛋白酶的报道, 仅 David (1978) 推测有可能存在。本文报告这一研究结果。

## 材料和方法

### 1. 材料和试剂

PbGV 是从新疆乌鲁木齐市郊甘蓝上病死幼虫分离的。酪蛋白系 Merck 产品。二异丙基氟磷酸 (DFP) 系 BDH 产品。二硫苏糖醇 (DTT) 系 Fluka 产品。标准分子量蛋白质 (14,000-71,000) 系 BDH 产品。牛血清白蛋白系本所生化试剂厂产品。

紫外分光光度计系美国 DMS-90 型。

本文于 1985 年 1 月收到。

本所杨向明、刘敏同志提纯部分 PbGV 样品, 特此致谢。

## 2. 大菜粉蝶颗粒体病毒包含体、病毒粒子及包含体蛋白的纯化

采集田间自然罹病之死虫,研碎、过滤,经差速离心和乙醚抽提脂肪物后得到病毒粗提物。用此粗提物人工感染大菜粉蝶幼虫,待收集多量虫尸后,基本按 Brown 等(1977)方法分离纯化病毒包含体,纯净的病毒包含体制剂呈灰白色。

病毒包含体制剂加入等体积的 0.1M 碳酸钠-0.05M 氯化钠溶液,置 38℃ 水浴中碱解 30 分钟至 1 小时,随后加入 0.2M 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 使溶液达 pH 8.0 时中止反应,经 10,000rpm 离心 30 分钟,沉淀为未解离的包含体,上清液中为病毒粒子和包含体蛋白。经 10—60% (W/W) 蔗糖密度梯度超离心进一步分离病毒粒子和包含体蛋白。或按巫爱珍等(1978)方法用 Sephadex G-150 柱 (1.5 × 50 厘米) 层析分离病毒粒子和包含体蛋白,透析浓缩各分部收集液。蛋白质浓度用 Lowry (1951) 法测定。

## 3. 蛋白酶的测定

(1) 酪蛋白底物法 参考 Deborah 等(1975)方法并做修改:取 200 微升包含体蛋白(4 毫克/毫升),加入 200 微升 1% (W/V) 经热变性处理的酪蛋白溶液,再加入 200 微升 0.1M 碳酸钠,置 38℃ 水浴温育 1 小时或 4 小时,随后加入 20% 三氯醋酸使终浓度达 5%,静置充分沉淀后,在 3,000rpm 离心 10 分钟,取一定量上清液用蒸馏水适当稀释之,测定其在 280 毫微米波长的紫外光吸收值。对照管中仅含包含体蛋白不加酪蛋白溶液,用以校正酶对包含体蛋白本身的降解。酶活力用每毫克含酶包含体蛋白降解酪蛋白产生的紫外光吸收值 (ABS) 表示。

(2) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 取少量病毒包含体制剂置 75—80℃ 水浴 30 分钟使酶失活。经热处理的及正常的病毒制剂均按前述步骤分离包含体蛋白。按 Laemmli (1970) 方法进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶浓度 10%,含 0.1% SDS,样品液含 1% SDS、2% 巯基乙醇,上样前在 100℃ 沸水加热 2 分钟,电流 30 mA,电泳完毕后用 10% 三氯醋酸浸泡过夜,用 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染色。根据同一块胶板上标准分子量蛋白质迁移率测定样品各区带之分子量。

## 4. pH、温度对酶活力的影响

分别设置在 pH 7.5、8.3 (0.1 M Tris-HCl 缓冲体系)、8.8、9.4、10.1、10.5、10.8、11.5—12.0 (0.1M 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲体系),按 3.(1) 方法测定酶活力的变化。

分别设置在 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 测定不同温度时酶活力大小。水浴温度控制在  $\pm 1^\circ\text{C}$ ,固定反应 pH 为 9.4,其他条件同前。

## 5. 酶的抑制

含 0.5 毫克包含体的病毒制剂与下列不同浓度的抑制剂在 38℃ 保温 1 小时:  $5 \times 10^{-3}\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ ,  $5 \times 10^{-4}\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ ,  $1.0 \times 10^{-2}\text{M}$  乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA),  $1.0 \times 10^{-2}\text{M}$  DTT,  $4.0 \times 10^{-3}\text{M}$   $\text{Cu}^{++}$ , 5mM 和 50mM DFP,作用后的抑制剂通过 10,000rpm 离心 30 分钟分离上清除去,用蒸馏水洗二遍,碱解后按前述方法以酪蛋白为底物测定酶活力,反应 pH 为 9.4。亦将抑制剂直接加入酶反应体系中测定对酶活力的影响。

## 6. 酶的定位

取一份病毒包含体直接加入到反应体系中。另取一份同样数量的病毒包含体按前述步骤分离纯化出包含体蛋白和病毒粒子,再分别测定酶活力。

## 结果和讨论

### 1. PbGV 包含体结合的碱性蛋白酶

从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱中观察到(图 1), 分子量为 26,500 道尔顿的 PbGV 包含体蛋白 (P26), 在碱性条件下经一段时间温育后降解产生了两个分子量各为 19,500 (P19) 和 15,600 (P15) 的多肽, 随着温育时间延长, P19 和 P15 的量也增加(见图 2)。但当经过 75℃ 以上加热处理后, 电泳谱中仅出现 P26 的区带, 此现象与 Tweenen 等 (1978) 的结果相似, 说明包含体蛋白确是受到蛋白水解酶的降解作用。当用 0.1N NaOH 碱解包含体后也得到与酶失活后同样的电泳结果(见图 1b)。

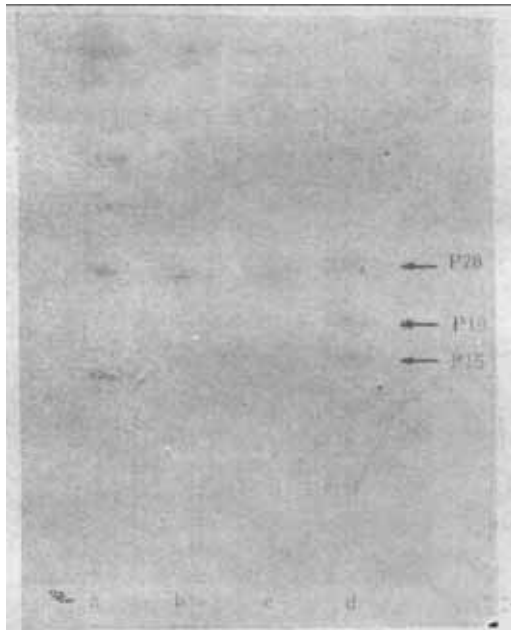


图 1 包含体蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳谱

a. 标准分子量蛋白质; b. 0.1N NaOH 碱解包含体; c. 75℃ 热处理使酶失活; d. 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 碱解包含体, 38℃ 温育 1 小时。

### 2. pH、温度对酶活力的影响

图 3 和图 4 表明, 结合于 PbGV 包含体的是一类碱性蛋白水解酶, 在 pH9.4 和 38—40℃ 时表现出较大的酶活力。在 60℃ 以上时酶即大部分失活。在测定 pH 对酶活力的影响时, 仅用了两种缓冲体系(表 1)。

### 3. 抑制剂对酶的作用

表 2 示 Hg<sup>++</sup> 能抑制大部分酶活力, 而 EDTA、DTT 和 Cu<sup>++</sup> 的抑制作用较小。5mMDFP 在直接加入酶反应体系时可百分之百抑制酶活力, 若用预先保温方法, 则在除去抑制剂 2—5 小时后, 酶活可恢复 10—30%。DFP 是丝氨酸型蛋白水解酶专一抑制剂, 故推测结合在 PbGV 包含体上的可能是一类与胰蛋白酶类似的蛋白水解酶。

Yamamoto 等 (1978) 曾报道用 1—2 M NaCl 溶液洗涤包含体, 可除去结合在包含

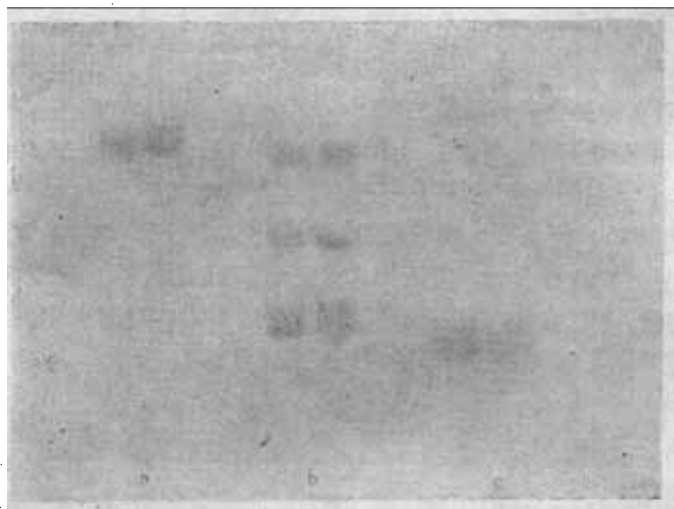


图2 温育不同时间碱解的包含体蛋白的电泳谱

a. 10 分钟; b. 1 小时; c. 5 小时

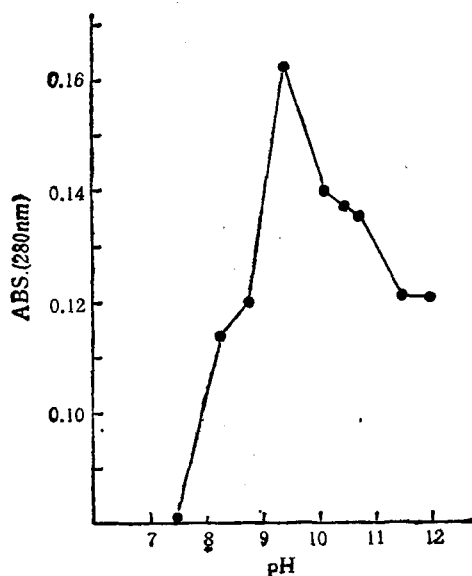


图3 pH 对 PbGV 碱性蛋白酶的影响

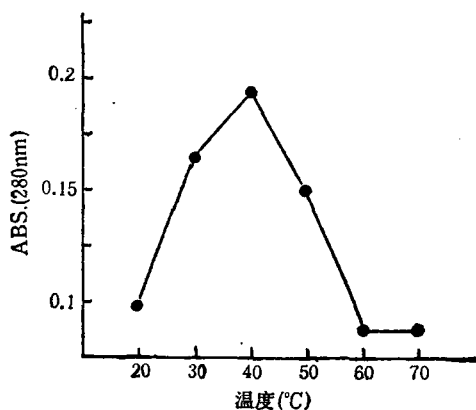


图4 温度对 PbGV 碱性蛋白酶的影响

体上的蛋白酶。我们重复此实验发现此法不能有效地除去 PbGV 碱性蛋白酶,一般可保留 70—80% 的酶活力。其后, Nagata 等 (1983) 也发现蛋白酶对包含体有很强的亲和性,故即使用 NaCl 溶液多次洗涤也难以完全除去。我们认为这与酶在包含体上的结合位置也有关系。

#### 4. 酶的定位

从表 3 看出,包含体蛋白保留的酶活力大于完整包含体,二者在相同条件下测定且含有相同量酶蛋白,这说明此酶不是结合在包含体的表面,而可能是结合于与病毒粒子套膜接触的包含体蛋白中,而病毒粒子在分离了包含体蛋白后仍保留有少量酶活性的事实,似

表 1 在不同 pH 的酶活力变化

| pH   | 缓 冲 体 系                                                 | 相对保留酶活力(%) |
|------|---------------------------------------------------------|------------|
| 7.5  | 0.1MTris-HCl                                            | 52.3       |
| 8.3  | 0.1MTris-HCl                                            | 72.6       |
| 8.8  | 0.1MTris-HCl                                            | 75.5       |
| 9.4  | 0.1MNa <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -NaHCO <sub>3</sub> | 100.0      |
| 10.1 | 0.1MNa <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -NaHCO <sub>3</sub> | 86.6       |
| 10.5 | 0.1MNa <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -NaHCO <sub>3</sub> | 85.4       |
| 10.8 | 0.1MNa <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -NaHCO <sub>3</sub> | 84.3       |
| 11.5 | 0.1MNa <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -NaHCO <sub>3</sub> | 76.0       |

表 2 抑制剂对 PbGV 碱性蛋白酶的作用

| 抑制剂              | 浓 度 (M)            | 相对保留酶活力(%) |
|------------------|--------------------|------------|
| 对照               |                    | 100.0      |
| EDTA             | $1 \times 10^{-2}$ | 83.0       |
| DTT              | $1 \times 10^{-2}$ | 78         |
| Cu <sup>++</sup> | $4 \times 10^{-3}$ | 69         |
| DFP              | $5 \times 10^{-3}$ | 38         |
| DFP              | $5 \times 10^{-2}$ | 0          |
| Hg <sup>++</sup> | $5 \times 10^{-3}$ | 26         |
| Hg <sup>++</sup> | $5 \times 10^{-4}$ | 45         |

亦可证明这一点。

Summers 等 (1975) 认为, 酶可能与病毒的解离有关。我们比较了酶失活与未失活条件下病毒包含体在 0.05M 碳酸钠中溶解与时间的关系, 发现当酶失活后, 包含体的解

表 3 不同组分表现的酶活力

| 组 分      | 相对酶活力 (%) |
|----------|-----------|
| 完整包含体    | 92.7      |
| 包含体蛋白    | 100.0     |
| 具套膜的病毒粒子 | 19.8      |

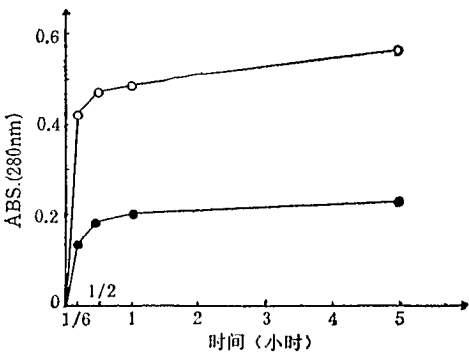


图 5 病毒包含体解离与酶的关系

○——○ 酶未失活, 0.05 M碳酸钠碱解, 38℃ 温育。●——● 酶经 75℃ 加热失活, 余同上。

离即大大减少(见图 5),这意味着病毒粒子的释放速度减小。另外推测除了酶的原因外,加热处理也可能使包含体蛋白的溶解性质改变。

至于酶失活后 PbGV 对寄主的感染性是否改变,以及 Nagata 等(1983)认为杆状病毒包含体上结合的碱性蛋白酶来源于昆虫中肠消化液等,都是值得进一步研究的问题。

## 参 考 文 献

- 巫爱珍等 1978 以双链核糖核酸为基因组的病毒的研究: 家蚕细胞质多角体病毒的简易纯化及其性质。生物化学与生物物理学报 10: 381。
- 齐义鹏等 1986 大蜡螟 (*Galleria mellonella*) 核型多角体病毒蛋白水解酶的研究。病毒学杂志 1: 36。
- Brown, D. R., et al. 1977 Biophysical properties of the structural component of a granulosis virus isolated from the cabbage white butterfly (*Pieris brassicae*). *Virology* 31: 317.
- David, W. A. L. 1978 The granulosis virus of *Pieris brassicae* (L.) and its relationship with its host. *Adv. Virus Res.* Vol. 22: 112.
- Deborah A., et al. 1975 Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the cabbage looper. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 62: 478.
- Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680.
- Lowry, O. H., et al. 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- Nagata, M. et al 1983 Origin of an alkaline protease associated with the capsule of a granulosis virus of the armyworm *Pseudaleia unipuncta* (Howorth). *Arch. virol.* 76: 245.
- Summers, Max D., et al. 1975 *Trichoplusia ni* granulosis virus granulins: a phenol soluble phosphorylated protein. *J. Virol.* 16: 1108.
- Tweeden, E. A., et al. 1978 Characterization of an alkaline protease associated with a granulosis virus of *Plodia interpunctella*. *J. Virol.* 261: 102.
- Yamafuji, K., et al. 1960 Desoxyribonuclease and protease in polyhedral viral particles. *Enzymologia.* 22: 1.
- Yamamoto, T., et al. 1978 Phospholipid, an enhancing component in the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm. *Pseudaleia unipuncta*. *J. Invertebr. Pathol.* 31: 48.

## STUDIES ON THE GRANULOSIS VIRUS OF *PIERIS BRASSICAE* (L.): AN ALKALINE PROTEASE ASSOCIATED WITH THE INCLUSION BODY PROTEIN

MENG JIN-JUN LI WEI-QI

(Xinjiang Institute of Chemistry, Academia Sinica)

An alkaline protease was found to be associated with the inclusion body protein of a virus infecting *Pieris brassicae* (L.). An assay procedure of the properties of the protease was developed by using casein as the substrate. The protease was located within the inclusion body proteins which surrounded the enveloped virus particles (virion). In high pH, it hydrolyzed the major constituent of the inclusion body protein, a 26,500-dalton protein (granulin), to two polypeptides with molecular weights of 19,500 and 15,600. It displayed higher activity at pH 9.4 and was partially inhibited by  $Hg^{++}$  and  $Cu^{++}$ , and completely inhibited by diisopropyl phosphorofluoridate. The rate of the release of virion was greatly decreased when the virus inclusion body was heated above 75°C, so it implies that this enzyme may play an important role in the infecting process of PbGV.

**Key words** Granulosis virus of *Pieris brassicae* (L.)—inclusion body protein—alkaline protease